

Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/AKT/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD

| | |
|------|--|
| 著者 | 田中 優子 |
| 内容記述 | Thesis (Ph. D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 2576, 2012.2.29 Joint authors: Yuria Saito ... [et al.] Offprint. Originally published in: American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, v. 302, no. 6, pp. 615-625, 2012 Includes supplementary treatise Includes bibliographical references |
| 発行年 | 2012 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/118054 |

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 (本籍) | た な か ゆ う こ 田 中 優 子 (茨 城 県) |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 博 乙 第 2576 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 24 年 2 月 29 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 審 査 研 究 科 | 人間総合科学研究科 |
| 学 位 論 文 題 目 | Sunitinib induces Apoptosis in Pheochromocytoma Tumor Cells by Inhibiting VEGFR2/AKT/mTOR/S6K1 Pathways Through Modulation of Bcl-2 and BAD |

| | | | | |
|---|---|---------|---------|---------|
| 主 | 査 | 筑波大学教授 | 博士 (医学) | 西 山 博 之 |
| 副 | 査 | 筑波大学教授 | 博士 (医学) | 大根田 修 |
| 副 | 査 | 筑波大学准教授 | 博士 (医学) | 矢 作 直 也 |
| 副 | 査 | 筑波大学講師 | 博士 (医学) | 福 島 敬 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

悪性褐色細胞腫は比較的稀な疾患であり、有効な治療法は未だ確立されていない。スニチニブは複数の受容体型チロシンキナーゼ阻害薬であり、腎細胞癌等に有効性が認められている。最近、悪性褐色細胞腫に対するスニチニブの有効症例の報告があるが、その機序の詳細は不明である。悪性褐色細胞腫においても細胞レベルでの腫瘍増殖抑制効果を確認することで臨床応用への道が拓けるものと考えられる。

今回スニチニブの血管新生抑制作用のみならず腫瘍細胞への直接作用を有する可能性を考え検討を行った。

(対象と方法)

細胞としては、PC12 細胞および SK-N-SH 細胞を用いた。各種蛋白発現については、p-AKT, AKT, p-70S6K, 70S6K, p-mTOR, p-4E-BP-1, 4E-BP-1, Bcl-2, Bcl-xL および HIF-1 α 等の抗体を用いた Western Blot 法を行った。スニチニブの効果判定は Apoptosis assay および proliferation assay を用いて評価した。具体的には Apoptosis assay としては、TUNEL assay および DNA fragment を photometric enzyme-immunoassay により評価する方法を用いた。更に Caspase-3 による PARP の分解を確認した。Proliferation assay としては、MTT assay および BrdU assay を行った。また細胞周期関連分子の発現についても検討した。Small interfering RNA transfection 法を用いて PC12 細胞に siRNA を導入し、細胞内の VEGFR2 および S6K1 の発現を低下させ、スニチニブ刺激を行った。統計学的検討は、Student's *t*-test にて行った。

(結果)

スニチニブにより PC12 細胞は時間 / 容量依存的にアポトーシスを誘導した。アポトーシス誘導には、Bcl-2 発現低下と BAD 活性化が寄与することが確認された。経路として AKT、mTOR および S6K1 が関与していることが示された。また HIF-1 α に対するスニチニブの効果について検討したが影響は認めなかった。

VEGFR2 をノックダウンすると、その下流の AKT、mTOR のリン酸化抑制や Bcl-2 発現低下等のスニチニブにより誘発される現象は解除された。すなわち、スニチニブの直接的抗腫瘍効果は VEGFR2 を介するこ

とが示唆された。S6K1 のサイレンシングでは、スニチニブと同様に、アポトーシス誘導や BAD のリン酸化減少や Bcl-2 減少を促進した。すなわち、スニチニブは S6K1 阻害により、PC12 細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。種の異なる second model である SK-N-SH 細胞においても、スニチニブ刺激にてアポトーシス誘導、増殖抑制、AKT・mTOR のリン酸化抑制を認め、PC12 細胞での key finding に関して再現性が確認された。

(考察)

スニチニブ刺激は、腫瘍細胞において抗アポトーシス因子 Bcl-2 の減少とアポトーシス促進因子 BAD の活性化を認め、その結果アポトーシスを促進している。また、この作用は VEGF2 型受容体 /Akt/mTOR 系およびその下流の S6K の抑制を介していることが示唆された。

今後の課題としては、まずスニチニブ刺激により PC12 細胞の VEGFR2 の発現が変化するかを確認する事、PC12 細胞に発現している他のレセプターについても検討する事が重要であると思われる。また、ERK についてはスニチニブ刺激によるリン酸化の抑制を確認しているが、アポトーシス誘導への別の経路の関与について検討する事も重要であろう。

今回の研究結果から、S6K1 のノックダウンにてアポトーシスが誘導されたことから、mTOR の下流は S6K1 が関与していることが考えられる。今後、S6K1 を過剰発現させ、スニチニブ刺激を行い、アポトーシスが抑制されることを確認する予定である。本研究の限界点は in vitro での抗腫瘍効果を検討しているのみである点であり、将来的な臨床応用を検討する上で、in vivo (xenograft 等) における抗腫瘍効果について検討する必要がある。特に血管新生抑制効果と直接的抗腫瘍効果のどちらがより抗腫瘍効果を担っているかについても検討する予定である。

今回の研究から、スニチニブは腫瘍細胞に対して、直接的な抗腫瘍活性を有することが示された。現在、他の分子標的薬にて研究を進めている。分子標的治療の効果予測が可能になると、将来的に褐色細胞腫においても個別化治療が検討できるようになることが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、褐色細胞腫に対する治療薬としてのスニチニブの可能性を示した論文であり、研究論文としての意義を有するものである。

平成 24 年 1 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。